

DER EINFLUSS VON SCHILDDRÜSENHORMONEN AUF
DIE SAURE ACETYLCHOLESTERYLESTER - HYDROLASE
UND IHRE BEDEUTUNG IN DER ENTSTEHUNG
DER ATHEROSKLEROSE

VERENA RÜTHLEIN

1985

*Diss
München*

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität
München

Vorstand: Prof. Dr. N. Zöllner

DER EINFLUSS VON SCHILDDRÜSENHORMONEN AUF DIE SAURE
ACETYLCHOLESTERYLESTER-HYDROLASE UND IHRE BEDEUTUNG
IN DER ENTSTEHUNG DER ATHEROSKLEROSE.

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Verena Rütthlein

Holzkirchen

1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. G. Wolfram

Mitberichterstatter: Prof. Dr. N. Zöllner

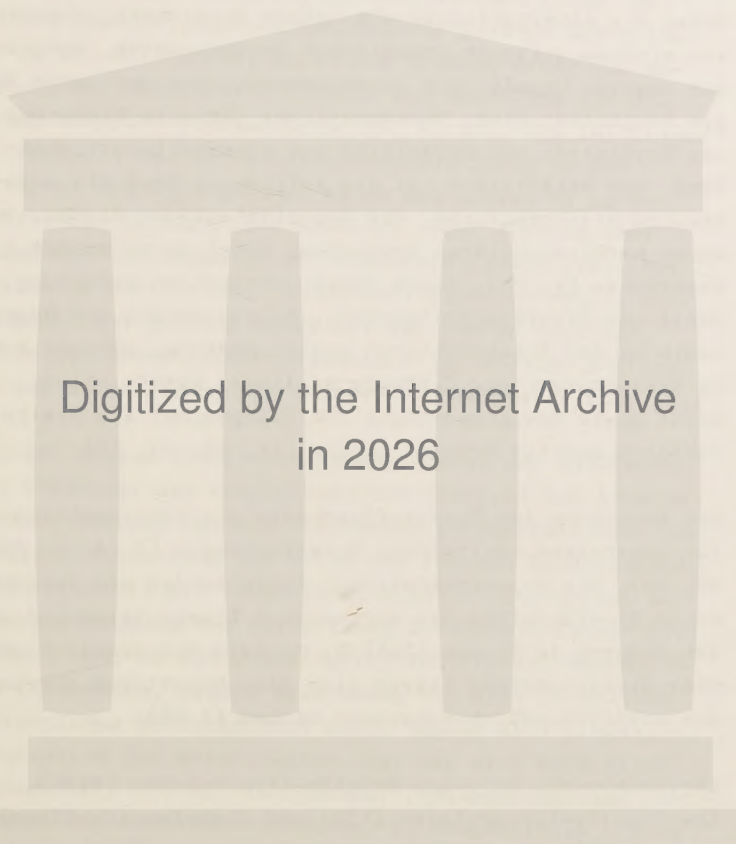
Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 5.12.1985

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	6
2. MATERIAL UND METHODEN	
2.1 Materialien	15
2.2 Herstellung der mononukleären Zellen	15
2.3 Inkubationsbedingungen	17
2.4 Herstellung der Zellextrakte für die Bestimmung lysosomaler Enzyme	17
2.5 Bestimmung der Sauren Acetylcholesterylester-Hydrolase (ACEH)	17
2.6 Bestimmung der N-Acetyl- β -D-Glukosaminidase (NAGA)	18
2.7 Lowry-Methode	19
2.8 Statistik	20
3. RESULTATE	
3.1 Feststellung der optimalen Meßbedingungen	21
3.1.1 Saure Acetylcholesterylester-Hydrolase	
3.1.2 N-Acetyl- β -D-Glukosaminidase	
3.2 Einfluß von Insulin, Cortison und L-Trijodthyronin auf die Aktivität der ACEH	22
3.3 Einfluß von Insulin, Cortison und L-Trijodthyronin auf die Aktivität der NAGA	22
3.4 Enzymaktivität in Abhängigkeit von verschiedenen L-Trijodthyroninkonzentrationen nach 24stündiger Inkubation in Monozyten-Makrophagen	22
3.4.1 Aktivität der ACEH	
3.4.2 Aktivität der NAGA	

3.5	Enzymaktivität von ACEH und NAGA in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit 0,01 µg/ml L-T ₃	23
4.	DISKUSSION	24
5.	ZUSAMMENFASSUNG	31
6.	ABBILDUNGEN	32
7.	LITERATURVERZEICHNIS	42
8.	ANHANG	53



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554811_0024

1. EINLEITUNG

Erkrankungen des Herzkreislaufsystems stehen in den Industrieländern an erster Stelle in den Mortalitätsstatistiken. Eine wichtige Rolle in der Pathogenese nimmt dabei die Atherosklerose ein, deren Entstehung, abgesehen von einigen seltenen genetischen Determinanten, maßgebend von unseren Umwelt- und Lebensgewohnheiten und deren Folgen beeinflusst wird. Voraussetzung für eine Minderung der Morbidität und Mortalität der atherosklerotischen Herz- und Gefäßleiden ist die Aufklärung über die sogenannten Risikofaktoren, die das statistische Risiko, von einer kardiovaskulären Erkrankung befallen zu werden, ausdrücken (4, 25). Wegen ihrer vorrangigen Bedeutung zählt man Hyperlipoproteinämie, Nikotinabusus und Hypertonie zu den Risikofaktoren erster Ordnung, während andere Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Hypothyreose, Gicht sowie Bewegungsmangel und Übergewicht als Risikofaktoren zweiter Ordnung gelten (14, 47, 49, 56).

Die Beziehung des Fettstoffwechsels zur Atherosklerose ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (3, 4, 9, 22, 48, 50). Die wasserunlöslichen Fette bilden mit verschiedenen Eiweißstoffen die sogenannten Lipoproteine und werden dadurch im Plasma löslich. Mittels Ultrazentrifugation oder Elektrophorese lassen sich vier Haupttypen abgrenzen, die unterschiedlich atherogen wirken (4,66):

Chylomikronen, Very-Low-Density-Lipoproteine (VLDL), Low-Density-Lipoproteine (LDL) und High-Density-Lipoproteine (HDL). Die kurzlebigen Chylomikronen (HWZ ca. 4 - 5 min) und VLDL (HWZ ca. 1 - 3 Std) sind für den Transport der exogenen bzw. endogenen Triglyzeride aus Darm und Leber verantwortlich. Als Endprodukt ihres intravasalen Abbaus gelten die LDL. Sie transportieren beim Erwachse-

nen etwa 80% des im Plasma vorhandenen Cholesterins. Ihre HWZ beträgt ca. 2,5 Tage. LDL werden an spezifische Rezeptoren der Zellwand gebunden und durch Endozytose in die Zellen inkorporiert (9, 22, 47). Die aus den LDL freigesetzten Cholesterylester werden durch die lysosomale Saure Acetylcholesterylester-Hydrolase (ACEH) gespalten, das freigesetzte Cholesterin gelangt anschließend zu den Mikrosomen, wo es die Bildung neuer LDL-Rezeptoren und wahrscheinlich auch die Hydrolyse gespeicherter Cholesterylester hemmt (8, 9, 56). HDL initiieren den Transport des Cholesterins aus der Zelle in den Blutstrom. Von dort gelangt es in die Leber, wo es zur Synthese der Gallensäuren benötigt wird. Während mehr als 90% der Gallensäuren im enterohepatischen Kreislauf zirkulieren und für die intestinale Lipidresorption sorgen, geht eine geringe Menge mit der Faeces verloren, die für den menschlichen Organismus die einzige Möglichkeit zur Ausscheidung von Cholesterin darstellt (34, 56).

Störungen dieses Stoffwechselweges können zur Entstehung eines Atheroms, dem morphologischen Korrelat der Atherosklerose, führen, die als "chronisch fortschreitende, degenerative Erkrankung vor allem der inneren Arterienwand-schicht (Intima) mit Verhärtung, Elastizitätsverlust und Lichtungseinengung des betroffenen Gefäßabschnittes" (37) definiert ist. In einem anfänglich fettfreien, umschriebenen Intimaödem, dessen Entstehung auf eine Insudation von Blutplasma zurückgeführt wird, lagern sich Lipide, hauptsächlich Cholesterylester, ab, die sich anfänglich nur intrazellulär, mit zunehmender Plaqueentwicklung jedoch auch extrazellulär anhäufen. Im wesentlichen werden sie in Monozyten-Makrophagen gespeichert, die sich in Schaumzellen umwandeln, wenn sie mit Cholesterylestern überladen sind (9, 17, 38).

Nach de Duve's Theorie liegt der Entstehung der athero-

matösen Schaumzelle ein funktioneller Mangel an ACEH-Aktivität in den Lysosomen zugrunde. Einstrom von Plasma-LDL, das reich an verestertem Cholesterin ist, erfordert in der Zelle saure proteolytische und lipolytische Aktivität für die Hydrolyse der Protein- und Esterkomponenten dieses Moleküls. Wenn die lysosomale Verdauung mit diesem Einstrom nicht Schritt halten kann, könnte selbst ein scheinbar geringfügiges Ungleichgewicht über Jahre hinweg zunächst zur Bildung von Schaumzellen, später zu massiver Ablagerung von extrazellulärem Lipid, das aus untergehenden Zellen frei wird, führen (16, 63).

Lysosomen, die Verdauungsorganellen der Zelle, sind membrangebundene, polymorphe, zytoplasmatische Strukturen, die eine Vielzahl saurer Hydrolasen, darunter der ACEH, enthalten. Durch Verschmelzung mit den durch Pinozytose aufgenommenen Vesikeln wie LDH oder zelleigenem Material entsteht aus einem primären ein sekundäres Lysosom, in dem der hydrolytische Abbau erfolgt (15, 34).

Obwohl die Lysosomen schon 1955 als eigenständige Zellorganellen erkannt worden waren (46), wurde erst in den letzten zehn Jahren ihre mögliche Beteiligung in der Pathogenese der Atherosklerose diskutiert. De Duve et al. (16) entdeckten bei der Untersuchung atheromatös veränderter Aortas von Kaninchen, die einer cholesterinreichen Diät ausgesetzt waren, daß die Aktivität verschiedener lysosomaler Hydrolasen mit zunehmendem Schweregrad der Atherosklerose bis zu zwölfmal höher als normal war, gleichzeitig jedoch zunehmend Lipide, hauptsächlich Cholesterylester, in den Lysosomen akkumulierten. Haley bestätigte diese Ergebnisse und identifizierte derartige Zellen morphologisch als Schaumzellen (24). Eine Untersuchung solcher Zellen zeigte das Vorkommen sowohl membrangebundener lysosomaler als auch freier zyto-

plasmatischer Lipidtropfen. Mit morphometrischen Techniken konnte nachgewiesen werden, daß sich annähernd 60 Prozent aller Lipidablagerungen in Schaumzellen von Kaninchenaortas in den Lysosomen befanden (53). Zellen aus atherosklerotischen Bezirken von 23 menschlichen Brusttaortas wiesen ebenfalls eine Akkumulation von Cholesteryleestern auf. Obwohl in diesen Zellen die Aktivitäten verschiedener lysosomaler Hydrolasen, darunter auch der ACEH, signifikant größer waren als in Zellen aus gesundem Gewebe, genügte diese Aktivitätssteigerung anscheinend nicht, um dem erhöhten LDL-Einstrom standzuhalten (20).

Alle diese Beobachtungen einer lysosomalen Stimulation als Kennzeichen der experimentellen und spontanen Atheromatose (63) finden eine mögliche Erklärung in der Duve's Theorie, daß der Lipidablagerung eine relative Verminderung der Aktivität der ACEH zugrundeliegt.

Die Aufgabe der Sauren ACEH besteht in der Hydrolyse der LDL-Cholesterylester. Das freigesetzte Cholesterin verhindert über die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase (56), vielleicht auch der HMG-CoA-Synthase (27), die Biosynthese von endogenem Cholesterin. Ungenügende ACEH-Aktivität führt zur generalisierten Anhäufung von Cholesteryleestern und schließlich zu irreversiblen atherosklerotischen Veränderungen (13, 57, 58). 1966 beschrieb Fredrickson vorzeitig atherosklerotische Patienten mit einem Mangel an lysosomaler ACEH. Das Fett in der Leber dieser Patienten bestand zum größten Teil aus Cholesteryleestern, deren Zusammensetzung den LDL-Cholesteryleestern glich (21). Die Saure ACEH ist daher ein wichtiges Glied für die Aufrechterhaltung einer ausgeglichenen zellulären Cholesterinbilanz.

Cholesterin ist das wichtigste Steroid im menschlichen

und tierischen Organismus. Im Serum kommt es zu einem Drittel als freies Cholesterin und zu zwei Dritteln als Cholesterylester (50% Linolsäure, 20% Ölsäure) vor. In Abhängigkeit vom Alter betragen die Normwerte des Cholesterins 150 - 250 mg% (49).

Der Cholesterinstoffwechsel ist hormonell beeinflussbar:

Insulin stimuliert die Aktivität der hepatischen HMG-CoA-Reduktase und regt damit die Cholesterinsynthese an, während Glukagon den Serum- und Gewebsspiegel von Cholesterin reduziert (33).

Östrogene zeigen abhängig von Dosis und Präparat sowohl hypo- als auch hypercholesterinämische Wirkungen. Während niedrige Östradioldosen bei Ratten einen erhöhten Serumcholesterinspiegel zur Folge haben, zeigen hohe Dosen den umgekehrten Effekt. Mestranol wirkt dagegen auch bei geringsten Dosen cholesterinsenkend (18).

Wie Henze u. Mitarb. an gezüchteten menschlichen Fibroblasten nachweisen konnten, bewirkt Hydrocortison in physiologischen Konzentrationen eine Verminderung der Cholesterinsynthese, obwohl es die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase steigert (27).

Bereits 1950 wiesen Peters & Man (43) auf den Zusammenhang zwischen erniedrigten Schilddrüsenwerten und Hypercholesterinämie hin. Der Anstieg des Serumcholesterins korreliert dabei mit dem Anstieg des thyreoidea-stimulierenden-Hormons (TSH). Seither wurde der Einfluß der Schilddrüsenhormone auf den Lipidstoffwechsel in zahlreichen Untersuchungen diskutiert (1, 39, 40, 41, 44, 52, 61, 62).

Die Schilddrüsenhormone liegen in zwei biologisch ak-

tiven Formen vor, dem 3,3',5,5'-L-Thyroxin (T_4) und dem 3', 3, 5-L-Trijodthyronin (T_3). Beide Hormone zirkulieren im Serum überwiegend proteingebunden. Ein inter- α -Globulin, das Thyroxin-bindende Globulin (TBG) bindet 80 Prozent des T_4 , während der restliche Teil vom Thyroxin-bindenden Präalbumin (TBPA) und Albumin transportiert wird. Lediglich 0,004 Prozent des T_4 sind frei. Da T_3 wesentlich schwächer gebunden wird, liegt der Anteil an freiem, metabolisch aktiven T_3 acht- bis zehnfach höher als bei T_4 (30). Von T_4 mit seiner relativ langen HWZ von sieben Tagen wird nur zehn Prozent des extrathyroidalen Hormonpools pro Tag umgesetzt bzw. zu T_3 dejodiert, während der umgesetzte Anteil des T_3 durch seine kurze HWZ von 24 Stunden bei etwa 60 Prozent pro Tag liegt. Beide Hormone haben die gleichen Wirkungen, T_3 wirkt jedoch schneller und fünffach stärker als T_4 (10, 51).

Normale Serumwerte für T_3 und T_4 sind (30):

Serum- T_4 ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)	$6,7 \pm 1,3$
Serum- T_3 ($\text{ng}/100 \text{ ml}$)	116 ± 18
T_3/T_4 -Quotient ($\times 10^3$)	$18,1 \pm 4,2$

Nach den gegenwärtigen Vorstellungen werden die Schilddrüsenhormone selektiv in die Zelle aufgenommen und an Rezeptormoleküle im Nukleolus gebunden, die möglicherweise durch Änderung der nukleären RNA-Synthese den Anstieg von Proteinsynthese und Enzymaktivitäten auslösen (10, 11, 51).

Ungenügende Hormonausschüttung führt zu verlangsamtem Abbau und nachfolgender Akkumulation von LDL-Cholesterin im Serum (1, 53, 62). Patienten mit Hypothyreose entwickeln daher eine verstärkte Tendenz, Cholesteryl-ester in den Arterienwänden abzulagern, die schon früh-

zeitig zu schweren Koronar- und Aortensklerosen führen kann (32, 50). Zusätzlich lassen sich beträchtliche Mengen kurzlebiger LDL-Partikel nachweisen, die ebenfalls mit den Gefäßendothelien in Beziehung treten können und dort zur Cholesterinakkumulation beitragen (56). Durch rechtzeitige Zufuhr von Schilddrüsenhormonen bilden sich diese Veränderungen vollständig zurück (52, 62).

Bei der Hyperthyreose dagegen wird der Cholesterinumsatz beschleunigt, so daß diese Patienten aufgrund der Erniedrigung des LDL-Cholesterins eher zur Hypocholesterinämie neigen (2, 36, 40, 43).

Die zellulären Vorgänge, die zu einem veränderten Serumcholesterinspiegel unter dem Einfluß von T_3 führen, sind erst unzureichend aufgeklärt. Vor kurzem konnte man nachweisen, daß die LDL-Cholesterin-Aufnahme in die Zelle durch Schilddrüsenhormone gesteuert wird (11, 60). LDL-Cholesterin gelangt hauptsächlich durch rezeptorvermittelte, aber auch durch rezeptorunabhängige Endozytose in die Zelle (22, 38).

Chait et al., die die Wirkung von T_3 auf den Abbau von LDL in gezüchteten menschlichen Fibroblasten untersuchten, stellten fest, daß die Zellen, die in schilddrüsenfreiem Serum wuchsen, weniger LDL aufnahmen und abbauten als Zellen, zu deren Serum T_3 hinzugefügt worden war (11).

In einer Studie von Thompson (60) verzeichnete der Cholesterinumsatz eines hypothyreoten Probanden einen deutlichen Abfall der rezeptorvermittelten LDL-Abbaurate im Vergleich zu Kontrollpersonen. Nach Behandlung mit Thyroxin normalisierte sich der rezeptorabhängige LDL-Abbau. Diese Änderung war von einem bemerkenswerten Rückgang der Plasma-LDL-Konzentration begleitet.

Der Defekt des LDL-Katabolismus bei Hypothyreose beruht daher zumindest teilweise auf dem Fehlen von LDL-Rezeptoren an der Zelloberfläche. Zufuhr von Schilddrüsenhormonen führt offensichtlich zu vermehrter Synthese von LDL-Rezeptoren, die die adäquate Aufnahme von Plasma-Cholesterin ermöglichen (9).

DeMartino entdeckte, daß Thyroxin enzymatische Reaktionen fördert, die zur Bildung von Gallensäuren führen (40). Diese Ergebnisse konnten in einer anderen Untersuchung nicht bestätigt werden (1).

Sowohl tierexperimentell als auch an Patienten mit Schilddrüsendysfunktion konnte nachgewiesen werden, daß Schilddrüsenhormone die Aktivität von lysosomalen Fettstoffwechsellenzymen steuern (36).

In thyroideaektomierten Ratten wurde durch T_4 die Aktivität der sauren Lipase in der Leber, die den Abbau des HDL-Cholesterins regelt, um mehr als das Zweieinhalbfache ihres Ausgangswertes angehoben. Die Steigerung war dosisabhängig und erreichte nach 12 bis 24 Stunden ihren Höhepunkt (12).

Ähnlich reagierte die Saure ACEH in Leberhomogenaten thyroideaektomierter Ratten. Die Entfernung der Schilddrüse hatte einen signifikanten Abfall der Enzymaktivität zur Folge. Nach Gabe physiologischer Dosen von T_3 wurde ein Anstieg der ACEH-Aktivität um annähernd das Dreifache bei thyroideaektomierten bzw. das Eineinhalbfache bei euthyreoten Kontrollratten registriert (54).

Ziel unserer Untersuchung ist es, den Einfluß von Schilddrüsenhormonen auf die Aktivität von lysosomalen Enzymen in Monozyten-Makrophagen zu untersuchen.

Damit soll zur Beantwortung der Frage beigetragen werden, ob ein Defizit der lysosomalen Enzymaktivität in der Entstehung der atherosklerotischen Gefäßerkrankungen von Bedeutung sein könnte.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

Cholesteryl-1-¹⁴C-Oleat und 1-¹⁴C-Ölsäure stammten von New England Nuclear (Dreieich). Triton-X-100 wurde von Merck (Darmstadt) bezogen. Sigma Chemie GmbH (Taufkirchen) lieferte Cholesteryl-Oleat, Behring (Marburg) stellte Rinder-Serum-Albumin bereit und Serva Feinbiochemica (Heidelberg) lieferte Lecithin aus Eigelb sowie 4-Methylbelliferon. Von Paesel (Frankfurt) kam 4-Methylumbelliferyl-2-Acetymido-2-Desoxy-β-D-Glucopyranosid, Carl Roth (Karlsruhe) stellte Na-Taurocholat bereit. Von GIBCO Europe (Karlsruhe) wurde Hank's balanced Salt Solution bezogen. Ficoll-Trennlösung und RPMI 1640 Medium, Penicillin/Streptomycin kamen von der Blochrom KG (Berlin).

Im eigenen Labor hergestellt wurden PBS (40 g NaCl, 1 g KCl, 5,75 g Na₂HPO₄·x2H₂O, 1 g KH₂PO₄, in 5 l Muldestor gelöst) und Bray-Solution (40 g Naphtalin, 4 g PPO-Packard, 0,2 g POPOP-Packard, 20 ml Ethylenglykol, 100 ml Ethanol, mit Dioxin auf 1 l aufgefüllt).

2.2 Herstellung der mononukleären Zellen

Periphere mononukleäre Zellen wurden aus venösem Blut, das am Morgen einem Probanden angenommen und mit 10 I.E. Heparin/ml versetzt wurde, nach der Methode von Boyüm (6), modifiziert von Ho u.a. (29), isoliert.

Dabei wurden zunächst 15 ml Ficoll'sche Lösung in konische 50 ml Polypropylenröhrchen transferiert und vorsichtig mit je 20 ml Blut überschichtet. Anschließend zentrifugierte man 40 min bei 1500 rpm in einer Haereus Christ Labofuge 2 (Haereus Christ, Osterode/Harz). Nach

Beendigung der Zentrifugation waren die Blutzellen in zwei Fraktionen geteilt: einen milchig trüben Ring, bestehend aus mononukleären Zellen und Thrombozyten, der die Grenze zwischen Serum und Ficoll'scher Lösung bildete, und ein Sediment aus Erythrozyten und Granulozyten am Boden des Röhrchens. Die Interphase von ca. 5 ml wurde nun mittels einer Pasteurpipette in ein neues 50 ml Röhrchen transferiert, mit 30 ml Hank's Medium gut vermischt und 10 min lang bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Sediment in einem einzigen Polypropylenröhrchen kombiniert, das mit Hank's Medium auf 10 ml aufgefüllt wurde. Anschließend zählte man die Zellen in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Der Mittelwert aus 4 x 16 ausgezählten Kleinstquadraten x 5000 x ml Hank's Medium ergab die gesuchte Zellzahl. Jeweils ca. $7 \times 10^6 / 700 \mu\text{l}$ RPMI (1% Pen/Strep) wurden in eine Zellkultur-Schale aufgenommen, mit 300 μl autologem Serum vermischt und 24 Stunden inkubiert wie unten beschrieben. Nach der Inkubation wurden die nichtadhärenten Zellen abgesaugt, die Monozyten blieben in der Schale zurück. Nun wurden 990 μl RPMI (1% Pen/Strep) und 10 μl der angegebenen Hormonkonzentrationen hinzugefügt (Kontrolle: 10 μl NaOH/Glyzin). Nach einer weiteren Inkubation von 24 Stunden in zehnprozentigem fetalen Kälberserum wurde das Medium wieder abgesaugt, die Zellen in PBS gewaschen und anschließend bei -20°C eingefroren. Unter diesen Bedingungen waren die Enzyme bis zu einem Monat stabil.

Wie aus früheren Untersuchungen (25) bekannt ist, gewinnt man bei dieser Methode über 95% lebende Zellen. Verschiedene Zählungen ergaben, daß 64 - 73% der frisch isolierten Zellen Lymphozyten waren, der Rest Monozyten. Nur gelegentlich konnte man Thrombozyten bei Untersuchung des Zellmaterials sehen.

2.3 Inkubationsbedingungen

Die Zellen wurden in einem Zellinkubator in einer Atmosphäre von 95 % feuchter Luft und 5 % CO₂ bei 37° C in Falcon-Plastik-Kulturschalen (35 x 10 mm) inkubiert.

2.4 Herstellung der Zellextrakte für die Bestimmung lysosomaler Enzyme

Die in Plastikpetrischalen eingefrorenen Monozyten wurden aufgetaut und in 700 µl Zellextraktlösung aufgelöst, die sich aus 0,25 M Sucrose (MG 342,3; 42,5 g/ 500 ml Muldestor), 1 M EDTA (MG 372; 186 mg/ 500 ml Muldestor), das 0,1 % (v/v) Ethanol enthielt, und Triton-X-100 (0,1 %; v/v) zusammensetzt. Nach sorgfältigem Mischen füllte man den Zellextrakt in 1 ml Eppendorf Röhrchen ab und fror sie bis zur Weiterverwendung wieder ein.

2.5 Bestimmung der Sauren Acetylcholesterylester-Hydrolase (E.C.3.1.1.31)

Die Saure ACEH in mononukleären Zellen wurde hauptsächlich nach der Methode bestimmt, die schon bei anderen Zelltypen benutzt wurde (59).

Für die Herstellung von 1 ml Substrat wurden in einem spitzzulaufenden Reagensglas Cholesteryl-1-¹⁴C-Oleat 1 µCi, 10 µmol Cholesteryl-Oleat und 0,8 µmol Lecithin aus Eigelb in Benzol vermischt und in Stickstoff getrocknet. Na-Taurocholat (0,25 ml von 2,4 mmol/l) wurde hinzugefügt und die Mischung eisgekühlt mit dem Mikrotip eines Branson Sonifier B12 (Branson Sonic Power Comp., Danbury, Conn.) für 4 x 20 Sekunden auf Stufe 5 beschallt. Daraufhin gab man 0,25 ml Rinderserumalbumin

(200 $\mu\text{g/ml}$) und 0,2 mol/l Na-Acetat-Puffer, pH 4,0 hinzu und mischte sorgfältig. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von 100 μl Zellextrakt zu 100 ml Substrat in chloroformfesten Reagensgläsern gestartet. Die Inkubationszeit betrug 90 min bei 37° C. Man stoppte die Reaktion, indem man die Reagensgläser aus dem Wasserbad in Eis stellte und 3,25 ml Extraktlösung (Chloroform-Methanol-Heptan, 1,25 : 1,41 : 1), 1 ml 0,5 molaren Na-Carbonat-Bicarbonat-Puffer pH 10,5, sowie 30 μl 1 molare NaOH zugab. Nach sorgfältigem Mischen und 15minütigem Zentrifugieren bei 800 g und 4° C wurde ein Milliliter der oberen Phase in Szintillations-Fläschchen pipettiert und in 10 ml Bray in einem Packard Tri-Carb-Liquid Scintillation Spectrometer, Model 544 (Packard Instrument, Downers Grove, Ill.) jeweils 10 min lang gezählt. Eine Lösung einer radioaktiv-markierten Ölsäure wurde als Doppelbestimmung angefertigt.

Wie auch aus früheren Untersuchungen hervorgeht (25), ist die Enzymaktivität linear zu einer Proteinkonzentration bis zu mindestens 15 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$, linear zur Zeit bis zu 180 min, gesättigt mit Cholesteryloleat von 200 $\mu\text{mol/l}$ und hat ein pH-Optimum von 4.

Die optimierten Bedingungen wurden bei der Durchführung der Experimente berücksichtigt.

2.6 Bestimmung der N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (E.C.3.2.1.30)

Für die Messung dieses Enzyms wurde die fluorimetrische Methode von Peters et al. (45), modifiziert von Fowler et al. (19), verwendet, unter Anpassung an mononukleäre Zellen.

0,1 ml Zelleextrakt wurde 60 min lang bei 37° C mit 0,1 ml (0,2 M) 4-Methylumbelliferyl-2-acetamido-L-desoxy- β -D-glucosamid (MUG) in 0,25 mol/l Sucrose, die 0,1 mol/l Acetatpuffer pH 5,7 enthielt, inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 2 ml 50 mM NaOH-Glycinpuffer pH 10,5, der 5 mmol/l EDTA enthielt. Das freigesetzte 4-Methylumbelliferon wurde am Flourimeter Eppendorf (Nether & Heinz, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 366 μ m (Excitation) und 440 μ m (Emission) gemessen. Passende Enzym- und Substrat-Leerwerte wurden hergestellt. Standardkurven erhielt man, indem man 4-Methylumbelliferon im dazugehörigen Puffer mit 3 ml NaOH-Glycinpuffer vermischte und den Fluoreszenzbetrag wie oben beschrieben maß.

Bekanntlich (25) verhält sich hier die Enzymaktivität linear zur Proteinkonzentration bis zu 6 μ g/100 μ l, zur Zeit bis 90 min, ist gesättigt mit Substrat bei 1,5 mmol/l und hat ein pH-Optimum von 5,7.

2.7 Lowry-Methode

Die Lowry-Reaktion zur Proteinbestimmung (35) ist eine Erweiterung der Biuretmethode. Der im ersten Schritt gebildete Kupfer-Protein-Komplex reduziert ein Phosphomolybdat-Phosphowolframat-Reagens (Folin-Ciocolteau-Phenol-Reagens), wobei eine intensiv blaue Färbung entsteht.

Das Protein in Zellextrakten wird nach der Methode ohne TCA-Fällung bestimmt.

Zunächst wurden die hierfür erforderlichen Lösungen hergestellt. Lösung A: 10 % Na_2CO_3 in 0,1 N NaOH;
Lösung B: 0,0122 % $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ in 0,0244 % Na-K-

Tartrat. Für die Lösung C vermischte man 41 ml Lösung B mit 10 ml Lösung A unmittelbar vor der Proteinbestimmung.

Für den Standard (1 mg Protein/ml 0,1 N NaOH) vermischte man jeweils 20, 50 und 100 µl Albumin mit 100 µl Zellextraktlösung und füllte die Reagensgläser mit 0,1 N NaOH auf 500 µl auf. Die Proben bestanden aus jeweils 100 µl Zellextrakt und 400 µl 0,1 N NaOH, die Leerwerte entsprechend aus 100 µl Zellextraktlösung und 400 µl 0,1 N NaOH. Alle Werte liefen als Doppelbestimmungen. Im 30-Sekundentakt setzte man nun jeweils 1000 µl Lösung C hinzu. Nach genau 10 min wurden - wiederum um 30-Sekundentakt - 100 µl Folinreagens hinzugefügt. Anschließend wartete man 30 min, um dann mit der Messung der Extinktion am Spectral-Photometer (Perkin-Elmer, Überlingen) bei 750 nm.

Mittels Standardextinktion - Leerwert errechnete man den Mittelwert für 100 µg Albumin. Die gesuchten Proteinmengen ergaben sich dann aus der Formel:

$$\frac{E(\text{Probe}) - E(\text{Leerwert})}{E(100 \mu\text{g Albumin})} \times 100 = \mu\text{g Albumin im eingesetzten Volumen Zellextrakt}$$

2.8 Statistik

Zur Errechnung der Signifikanzniveaus wurde der Wilcoxon-Test verwendet.

3. RESULTATE

3.1 Feststellung der optimalen Bedingungen für die Messung der lysosomalen Enzyme in Monozyten-Makrophagen

3.1.1 Saure Cholesterylester-Hydrolase (ACEH)

Wie Abb. 1 zeigt, entwickelte die ACEH ihre größte Aktivität bei einem pH von 4,0; pH-Erhöhung führte zu einem Aktivitätsabfall, bis schließlich im neutralen Bereich keine Aktivität mehr meßbar war.

Die Hydrolyse verlief bis zu einer Cholesteryloleatkonzentration von ca. 100 $\mu\text{mol/l}$ dem Substratangebot proportional und war ab einer Konzentration von 200 $\mu\text{mol/l}$ eindeutig mit Substrat gesättigt.

Im Meßansatz war die Aktivität der ACEH bis zu einer Proteinkonzentration von mindestens 15 μg linear (Abb. 2). Bei dieser Eiweißkonzentration waren 0,6 % der Cholesterylester hydrolisiert.

Die Zeitabhängigkeitsprüfung ergab einer Linearität bis 120 Minuten.

3.1.2 N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (NAGA)

Folgende optimale Meßbedingungen wurden für die Messung der NAGA-Aktivität erzielt (Abb. 3 und 4):

Das pH-Optimum lag im sauren Bereich bei 5,6, neutrales Medium führte zu einem Stillstand der Enzymaktivität.

Bis zu einer Substratkonzentration von 0,7 mM hydroly-

sierte die NAGA proportional zur angebotenen Menge, die Sättigung war bei einer Substratkonzentration von 1,5 mM erreicht.

Die Aktivität der NAGA verlief bis zu einer Eiweißkonzentration von mindestens 6 μg Protein linear, die Zeitabhängigkeit ergab Linearität bis zu einer Inkubationszeit von 60 Minuten.

3.2 Einfluß von Insulin, Cortison und L-Trijodthyronin auf die Aktivität der ACEH

Wie in Abb. 5 dargestellt, wurde nach 24stündiger Inkubation die Aktivität der ACEH von allen drei Hormonen stimuliert, die größte Aktivitätssteigerung wurde dabei nach Einwirkung von L-T₃ beobachtet.

3.3 Einfluß von Insulin, Cortison und L-Trijodthyronin auf die Enzymaktivität der NAGA

Die NAGA zeigte in ihrem Aktivitätsverhalten keinen Unterschied zur ACEH. Inkubation mit L-T₃ führte zu einem deutlichen Aktivitätsanstieg dieses Enzyms. Auch mit Insulin und Cortison konnte die NAGA-Aktivität gesteigert werden (Abb. 6).

3.4 Enzymaktivität in Abhängigkeit von verschiedenen L-Trijodthyroninkonzentrationen nach 24stündiger Inkubation in Monozyten-Makrophagen

3.4.1 Aktivität der ACEH

Die angebotenen L-T₃-Konzentrationen lagen in der Größenordnung von 0,001 $\mu\text{g/ml}$ bis 10 $\mu\text{g/ml}$. Die signifikant größte Aktivität wurde mit 0,01 $\mu\text{g/ml}$ L-T₃ erreicht,

bei der die ACEH durchschnittlich $117 \% \pm 14$ über dem Kontrollwert lag. Mit zunehmender L-T₃-Konzentration sank die Aktivität kontinuierlich ab (Abb. 7).

3.4.2 Aktivität der NAGA

Auch bei der NAGA wurde bei einer Konzentration von 0,01 µg/ml L-T₃ der signifikant größte Aktivitätszuwachs (119 ± 15) verzeichnet. Mit steigender Konzentration von L-T₃ ließ sich jedoch keine eindeutige Aktivitätsänderung ausmachen (Abb. 8).

3.5 Enzymaktivität von ACEH und NAGA in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit 0,01 µg/ml L-T₃

Abb. 9 und 10 zeigen, daß beide Enzyme in der gemessenen Zeitspanne von ein bis 48 Stunden gleichartig reagierten. Nach einem initialen Aktivitätsabfall in den ersten sechs Stunden zeichnete sich ein Aktivitätsanstieg ab, der nach 24 Stunden seinen Höhepunkt erreichte. Die 48-Stunden-Messung verzeichnete demgegenüber wieder einen leichten Rückgang der Enzymaktivität, lag aber insgesamt noch deutlich über dem Kontrollwert.

4. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde die Saure ACEH in Monozyten-Makrophagen hinsichtlich ihrer Beeinflußbarkeit durch Schilddrüsenhormone untersucht. Die NAGA, die nicht direkt in den Fettstoffwechsel eingreift, sondern bei der Hydrolyse von Glykoproteinen eine Rolle spielt, wurde als Markerenzym bestimmt, um feststellen zu können, ob T_3 den Fettstoffwechsel selektiv fördert oder ob enzymatische Vorgänge allgemein beeinflußt werden.

Unsere Untersuchungen ergaben, daß die Aktivitäten beider Hormone in Monozyten-Makrophagen durch T_3 angeregt werden. Nach 24stündiger Inkubation mit $0,01 \mu\text{g/ml } T_3$ war sowohl bei der Sauren ACEH als auch bei der NAGA der stärkste Aktivitätsanstieg zu verzeichnen.

Einen signifikanten Aktivitätsanstieg dieser beiden Hormone durch T_3 wiesen auch Severson et al. in Leberhomogenaten von thyroideaektomierten und euthyreoten Kontrollratten nach, die drei Tage lang mit $50 \mu\text{g}/100 \text{ g KG}$ behandelt worden waren. An Rattenherzen dagegen hatte T_3 keine Wirkung auf die Enzymaktivitäten von ACEH und NAGA (54).

Katz-Feigenbaum registrierte ein signifikantes Ansteigen der ACEH- und NAGA-Aktivitäten in Aorta-Homogenaten hypothyreoter Ratten, die eine Gesamtdosis von $16 \mu\text{g}/100 \text{ g KG } T_3$ innerhalb von acht Tagen erhalten hatten. In Leberhomogenaten war nur die Aktivität der Sauren ACEH, nicht aber die der NAGA signifikant erhöht (31).

In Hepatozytenhomogenaten thyroideaektomierter Ratten konnte eine dreitägige Hormongabe von je 50 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ KG T_3 lediglich die Enzymaktivität der Sauren ACEH deutlich anheben. In Adipozyten war überhaupt keine Wirkung der Schilddrüsenhormone nachweisbar (53).

Coates verglich die Aktivitäten von Saurer Lipase und NAGA in Leberhomogenaten hypothyreoter Ratten. Nach viertägiger Hormondosis von insgesamt 200 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ KG T_4 war die Aktivität der Sauren Lipase zweieinhalb-fach höher als bei unbehandelten hypothyreoten Ratten, während keine signifikante Aktivitätsänderung anderer lysosomaler Enzyme einschließlich der NAGA beobachtet wurde. Er nahm daher an, daß die Saure Lipase in der Leber entweder sensibler auf die Hormonbehandlung ansprach oder ihr Umsatz schneller war. Eine Spezifität dieses Enzyms wäre somit nur vorgetäuscht (12).

Über die Beeinflussung der Sauren ACEH in Leberhomogenaten durch Schilddrüsenhormone liegen widersprüchliche Aussagen vor. Auch hier könnte ein schnellerer Umsatz der ACEH eine Spezifität dieses Enzyms vortäuschen. Außerhalb der Leber ist keine ACEH-spezifische Wirkung von Schilddrüsenhormonen nachweisbar. In Intima-Media-Homogenaten von Rattenaortas und in menschlichen Monozyten-Makrophagen werden beide Enzyme durch T_3 aktiviert. Obwohl in unseren Untersuchungen nur ein Aktivitätsanstieg von 20 Prozent erzielt wurde, muß im Hinblick auf die Langzeitwirkung von T_3 selbst eine geringgradige Enzymstimulation als aussagekräftig gewertet werden.

Die optimale Aktivierung der Sauren ACEH in Monozyten-Makrophagen wurde durch eine T_3 -Konzentration von $0,01 \mu\text{g/ml}$ ($6,5 \times 10^{-9}\text{M}$) erreicht. Sie liegt damit um den Faktor 10 über der physiologischen Serumkonzentration. Ein geringerer Aktivitätsanstieg wurde bereits nach Inkubation mit $1 \text{ ng/ml } T_3$ und wieder mit $0,1 \mu\text{g/ml } T_3$ gemessen.

Chait et al., die die Wirkung von T_3 auf den LDL-Katabolismus in gezüchteten menschlichen Fibroblasten untersuchten, stellten nach 24stündiger Inkubation eine Steigerung von LDL-Bindung, -Aufnahme und -Abbau bis zu einer T_3 -Konzentration von 10^{-7}M fest (11).

Hillmar und Mitarbeiter untersuchten den Einfluß von Trijodthyronin auf die Cholesterin- und Triglyzeridbiosynthese in Primärkulturen von Hepatozyten erwachsener Ratten. Nach 48stündiger Inkubation mit physiologischen und hohen T_3 -Konzentrationen konnte eine dosisabhängige Stimulation von regulatorischen Enzymen der Lipidsynthese beobachtet werden. Das Aktivitätsmaximum lag bei einer T_3 -Konzentration von $5 \mu\text{g/ml}$ (28).

Eine maximale Enzymaktivierung wird in Zellkulturen durch supraphysiologische Dosen von Schilddrüsenhormonen erreicht. Mitverursacht durch die jeweilige Art der Aufbereitung, besitzen die einzelnen Zellarten und Enzyme möglicherweise eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber Schilddrüsenhormonen, die keine eindeutige Aussage über eine optimale T_3 -Dosis zur Enzymaktivierung zuläßt. Die für die Saure ACEH in Monozyten-Makrophagen gemessene optimale Schilddrüsenhormonkonzentration wird aufgrund der sofortigen Verarbeitung der Zellen aus frischem Serum

den Verhältnissen im menschlichen Organismus jedoch sicherlich nahe kommen. T_3 -Konzentrationen über 10ng/ml führten in unserer Untersuchung zu einem allmählichen Abfall der Cholesterylesterhydrolyse, der als erster Hinweis für eine beginnende Intoxikation der Zelle mit Schilddrüsenhormonen gewertet werden könnte.

Es ist noch nicht geklärt, welche Rolle lysosomale Enzyme in der Entstehung der Atherosklerose spielen. Das atherosklerotische Plaque, das durch einen Anstieg sowohl von extra- als auch von intrazellulärem Lipid, besonders Cholesteryleestern, charakterisiert ist, weist veränderte Enzymaktivitäten auf (7). In zwei Erbkrankheiten, der Cholesterylesterspeicherkrankheit und der Wolman-Krankheit, die beide extreme Lipidablagerungen mit nachfolgender Atherosklerose zeigen, besteht in allen Geweben ein Defizit an Saurer ACEH (13, 57).

In einer Untersuchung von Patienten mit Typ-II-Hypercholesterinämie wurde festgestellt, daß die ACEH-Aktivität in mononukleären Zellen signifikant niedriger und die Cholesterylesterspiegel entsprechend höher waren als in mononukleären Zellen einer normolipämischen Vergleichsgruppe. Obwohl die hypercholesterinämische Gruppe sowohl Personen mit heterozygoter familiärer Hypercholesterinämie (FHC) als auch mit anderen primären Ursachen von Hypercholesterinämie einschloß, war kein Unterschied zwischen diesen Personen in der ACEH-Aktivität oder anderen Parametern meßbar. Die reduzierte ACEH-Aktivität in mononukleären Zellen kann daher nicht einfach auf einer verminderten LDL-Rezeptorzahl, wie sie bei der FHC bekannt ist, beruhen (23).

Ob die erhöhte Cholesterylesterkonzentration im Zusammenhang mit der niedrigen ACEH-Aktivität in diesen Zellen einem genetischen Defekt zuzuschreiben ist oder einen Sekundäreffekt einer gesteigerten Lipidaufnahme durch rezeptorvermittelte oder rezeptorunabhängige LDL-Aufnahme darstellt, bleibt noch offen.

In normalen mononukleären Zellen war die ACEH-Aktivität in vitro ebenfalls signifikant vermindert, wenn diese Zellen einer für die primäre HC typischen LDL-Cholesterinkonzentration ausgesetzt waren (23).

Ein gegenteiliges Ergebnis brachte ein Experiment mit Ratten, die über mehrere Wochen hinweg cholesterinreich ernährt worden waren. Die Messung der Sauren ACEH und anderer lysosomaler Enzyme in Aorta-Homogenaten ergab eine signifikante Erhöhung der Enzymaktivitäten in diesem Gewebe, die bei der ACEH allerdings geringer ausgeprägt war als bei den anderen Enzymen (7).

Yatsu und Mitarbeiter untersuchten die ACEH in mononukleären Zellen von Patienten mit symptomatischer Atherosklerose. Bei normalem Cholesteringehalt im Plasma und in mononukleären Zellen war die Enzymaktivität signifikant herabgesetzt (65).

Da sich diese erniedrigte Aktivität auch an gesunden Probanden reproduzieren ließ, liegt die Möglichkeit nahe, daß erhöhte Cholesterylesterkonzentrationen in irgendeiner Form die aktiven Seiten der ACEH blockieren könnten. Die lysosomale Überladung mit Cholesteryleestern führt schließlich zum Austritt des lysosomalen Inhalts ins Zytoplasma, das charakteristisch für die Schaumzellen

in atherosklerotischen Läsionen ist (38).

Andere Untersuchungen konnten zeigen, daß menschliche Glatte-Muskel- und Adventitiazellen Cholesterylester akkumulieren, wenn sie hohen LDL-Cholesterinkonzentrationen ausgesetzt werden, und daß diese Zellen weit mehr Cholesterylester aufnehmen als der ACEH-Kapazität entspricht. Dabei wurde festgestellt, daß Cholesterin nach Sättigung der LDL-Rezeptoren über einen phagozytotischen, rezeptorunabhängigen Prozeß aufgenommen wird, der zu einer unkontrollierten Akkumulation von Cholesterylestern in den Glatten-Muskelzellen führt (3). Durch die intrazelluläre Cholesterylesteranhäufung wird gleichzeitig die rezeptorabhängige Aufnahme wichtiger Hormone und Nahrungsfaktoren gehemmt, die eine weitere Zellschädigung zur Folge hat (38).

Die zunächst widersprüchlich erscheinenden Befunde einer vermehrten wie verminderten Aktivität bei Untersuchung der ACEH in Atherosklerose könnten mit den Ergebnissen von de Duve und Mitarbeitern erklärt werden, die bei experimenteller Atherosklerose zunächst eine Steigerung einiger lysosomaler Enzymaktivitäten der Rattenaorta verzeichneten, später jedoch bei länger bestehender Atherosklerose die Aktivitäten vermindert fanden (16).

Zu Beginn der Atherosklerose besteht möglicherweise nur ein funktionelles Defizit der Sauren ACEH, die dem Überangebot an Cholesterylestern trotz vermehrter Aktivität nicht gewachsen ist. Die übermäßige Lipidakkumulation in den Lysosomen könnte schließlich das Enzym blockieren und die Cholesterylesterhydrolyse auf Dauer vermindern.

Es ist möglich, daß die im hypothyreoten Organismus frühzeitig auftretenden atherosklerotischen Ablagerungen u.a. als Folge eines Defizits der lysosomalen Säuren ACEH entstehen, das auf verminderte Enzym-Stimulation durch die Schilddrüsenhormone zurückgeführt werden kann.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Umwandlung von mononukleären Zellen in lipid-beladene Schaumzellen ist ein morphologisches Charakteristikum der Atherosklerose. Die Mechanismen, die der intrazellulären Lipidakkumulation zugrunde liegen, sind erst unzureichend aufgeklärt. Eine zu geringe lysosomale Enzymaktivität könnte in dieser Hinsicht von Bedeutung sein.

In dieser Arbeit wurden zunächst die optimalen Meßbedingungen für die lysosomalen Enzyme Saure Acetylcholesterylester-Hydrolase (EC 3.1.1.31) und N-Acetyl- β -D-Glukosaminidase (EC 3.2.1.30) in Monozyten-Makrophagen bestimmt.

Anschließend wurden die Zellen mit L-Trijodthyronin in unterschiedlicher Konzentration und Dauer inkubiert.

Die optimale Aktivierung wurde mit einer L-T₃-Konzentration von 0,01 μ g/ml nach 24stündiger Inkubation erreicht. Bei dieser Konzentration lag die ACEH-Aktivität um durchschnittlich 17% über der der Kontrolle.

Obwohl diese Steigerung geringfügig erscheint, muß sie im Hinblick auf die Langzeitwirkung von T₃ als aussagekräftig betrachtet werden.

Diese Resultate deuten darauf hin, daß eine verminderte Aktivität von lysosomalen Enzymen, die für den Lipidabbau verantwortlich sind, in der Entstehung von atherosklerotischen Gefäßerkrankungen bei hypothyreoter Stoffwechsellage von Bedeutung ist.

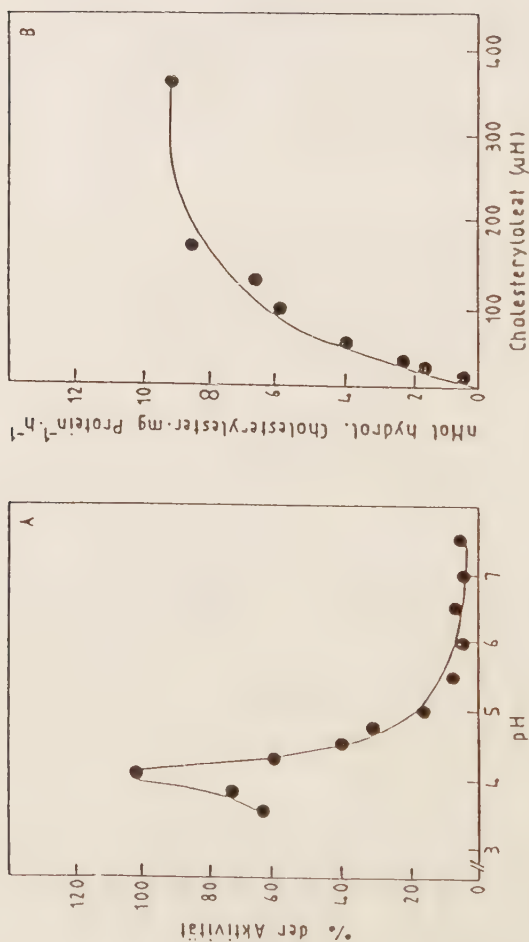


Abb. 1: Bestimmung der optimalen Meßbedingungen für die Aktivität der lysosomalen Säuren Cholesteryl ester-Hydrolase in Monozyten-Makrophagen. (A) pH-Optimum. Die Aktivität der ACEH wurde bei den angegebenen Werten gemessen und in % der Maximalaktivität eingetragen. (B) Sättigungskinetik. Jeweils 0,1 ml Zelleextrakt wurden mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Der hydrolysierte Cholesteryl ester wurde in $\text{nmol} \times \text{mg Prot}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ errechnet.

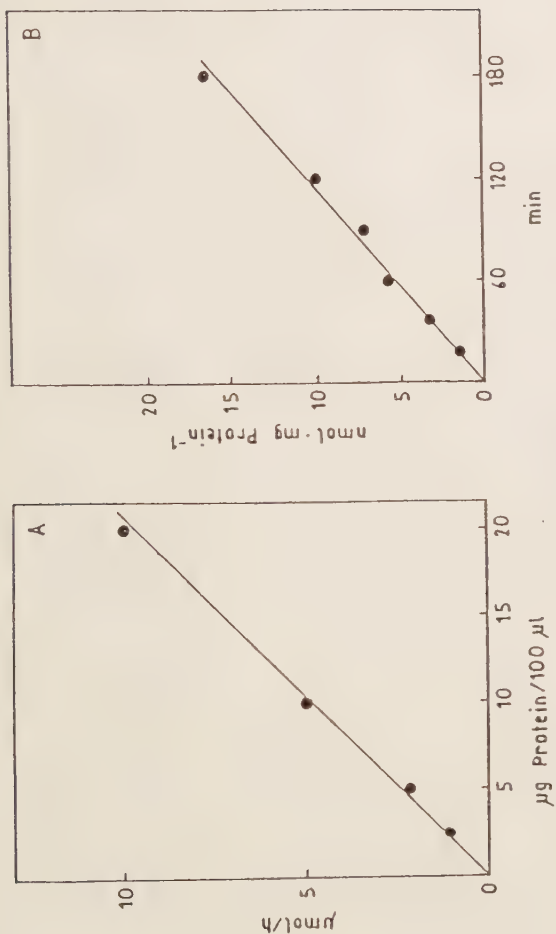


Abb. 2: Bestimmung der optimalen Meßbedingungen für die Aktivität der lysosomalen Säuren Cholesterylester-Hydrolase in Monozyten-Makrophagen. (A) Abhängigkeit vom zellulären Protein. Die Enzymaktivität wurde bei den dargestellten Proteinkonzentrationen untersucht und in μmol hydrolysiertes Cholesterylester $\times \text{h}^{-1}$ aufgetragen. (B). Zeitabhängigkeit. Die Aktivität der ACEH wurde jeweils nach den angegebenen Inkubationszeiten gemessen und in nmol/mg Protein dargestellt.

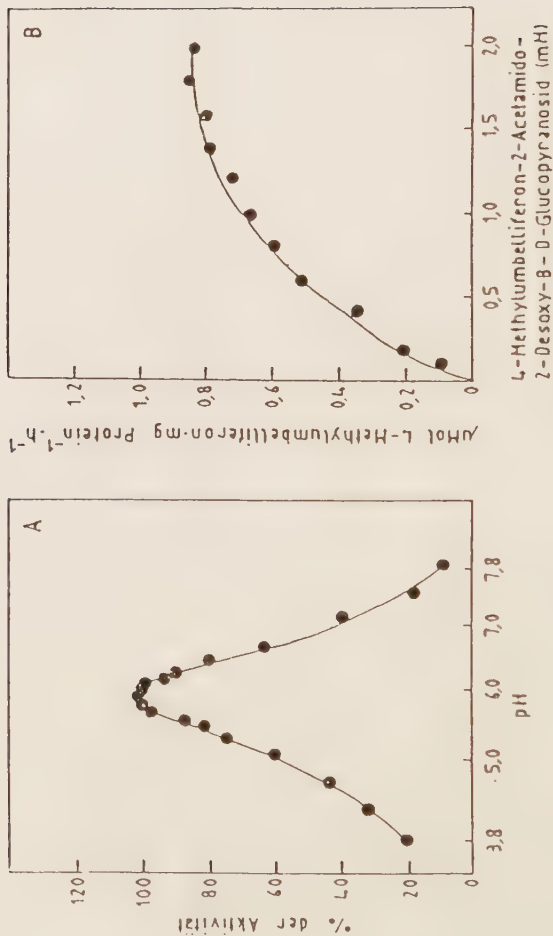


Abb. 3: Bestimmung der optimalen Meßbedingungen für die Aktivität der lysosomalen N-Azetyl- β -D-Glukosaminidase in Monozyten-Makrophagen. (A) Für die pH-Optimierung wurde die Enzymaktivität bei den angegebenen pH-Werten gemessen und in % der Maximalaktivität aufgetragen. (B) Sättigungskinetik. Jeweils 0,1 ml Zellaextrakt wurden mit den angegebenen Substratkonzentrationen inkubiert. Das freigesetzte 4-Methylumbelliferon wurde in $\mu\text{mol} \times \text{mg Prot}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ errechnet.

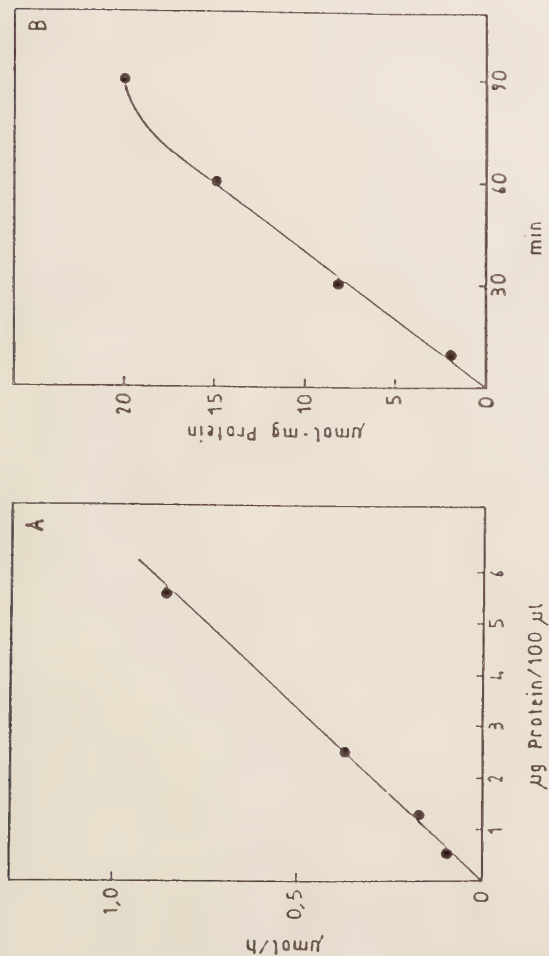
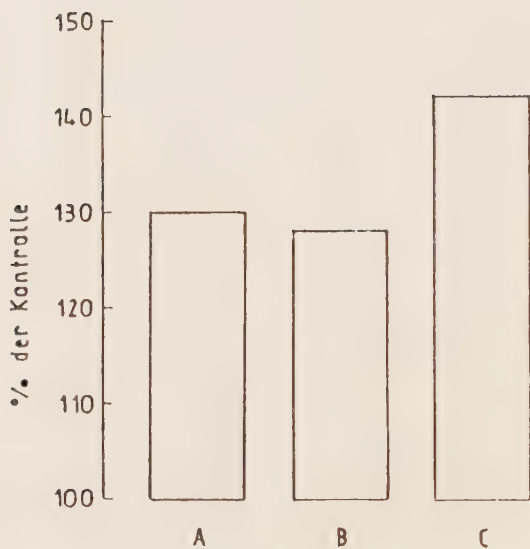


Abb. 4: Bestimmung der optimalen Meßbedingungen für die Aktivität der lysosomalen N-Azetyl- β -D-Glukosaminidase in Monozyten-Makrophagen. (A) Abhängigkeit vom zellulären Protein. Die Aktivität der NAGA wurde bei den dargestellten Proteinkonzentrationen untersucht, das freigesetzte Substrat in $\mu\text{mol/h}$ aufgetragen. (B) Zeitabhängigkeit. Die Enzymaktivität wurde jeweils nach den angegebenen Inkubationszeiten gemessen und als $\mu\text{mol} \times \text{mg Protein}^{-1}$ dargestellt.



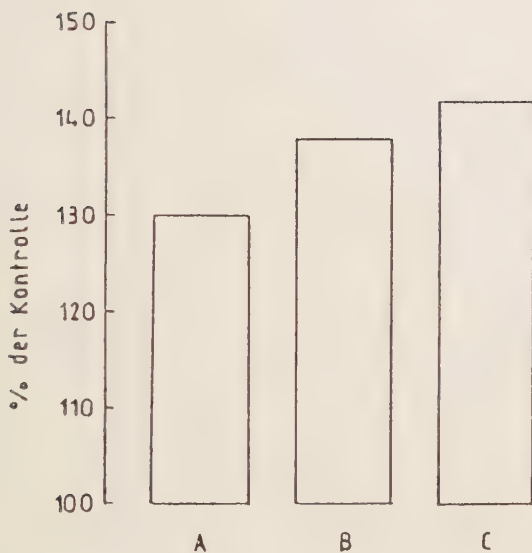
n = 4

A = Insulin (1 mU)

B = Cortison (10^{-8} M)

C = L-T₃ (1 mg)

Abb. 5: Effekt äquivalenter Hormondosen auf die Aktivität der ACEH in Monozyten-Makrophagen. Nach jeweils 24stündiger Inkubation mit den angegebenen Hormonkonzentrationen wurde die Enzymaktivität gemessen und in % des Kontrollwertes aufgetragen.



n = 4

A = Insulin (1 mU)

B = Cortison (10^{-8} M)

C = L-T₃ (1 mg)

Abb. 6: Effekt äquivalenter Hormondosen auf die Aktivität der NAGA in Monozyten-Makrophagen. Nach jeweils 24stündiger Inkubation mit den angegebenen Hormonen wurde die Enzymaktivität gemessen und in % des Kontrollwertes aufgetragen.

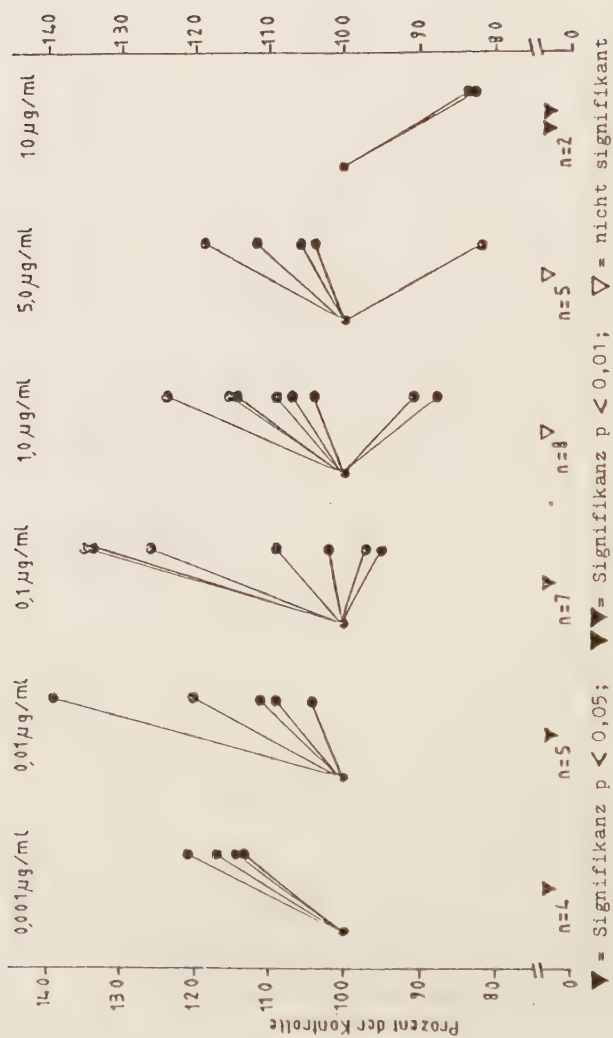


Abb. 7: Aktivität der Sauren ACEH in Monozyten-Makrophagen nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von $L-T_3$. Der Ausgangspunkt ist 100%, die Ergebnisse sind in % des Ausgangspunktes dargestellt.

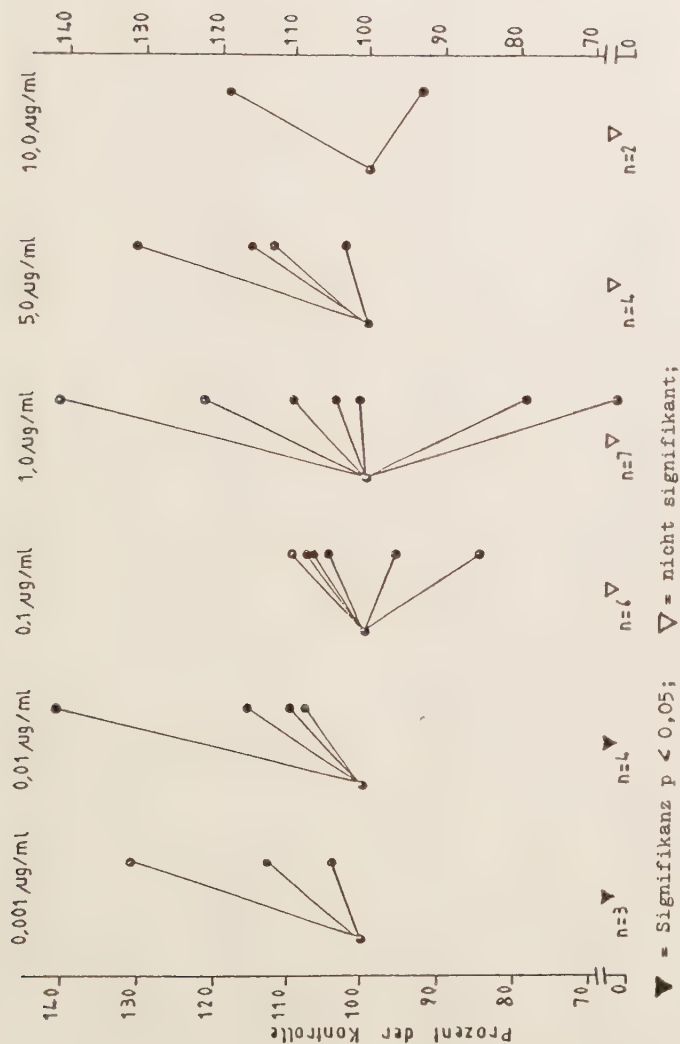
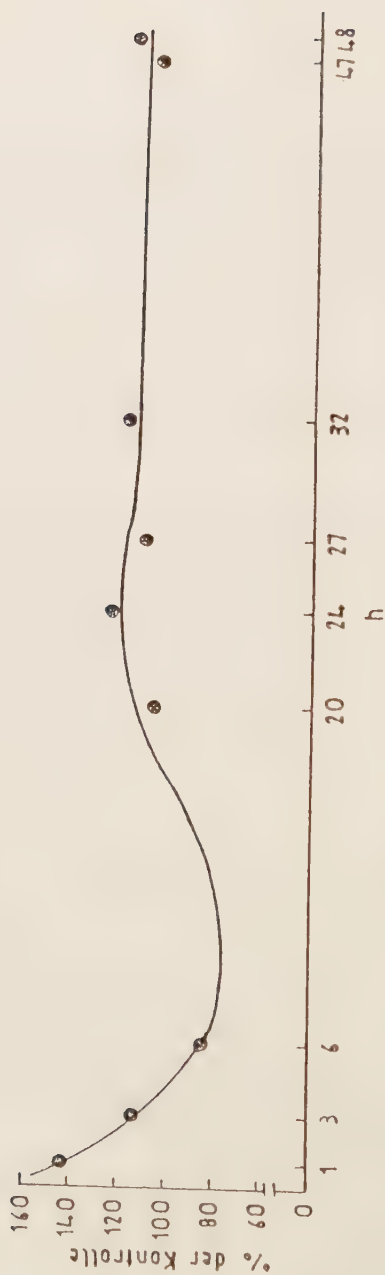
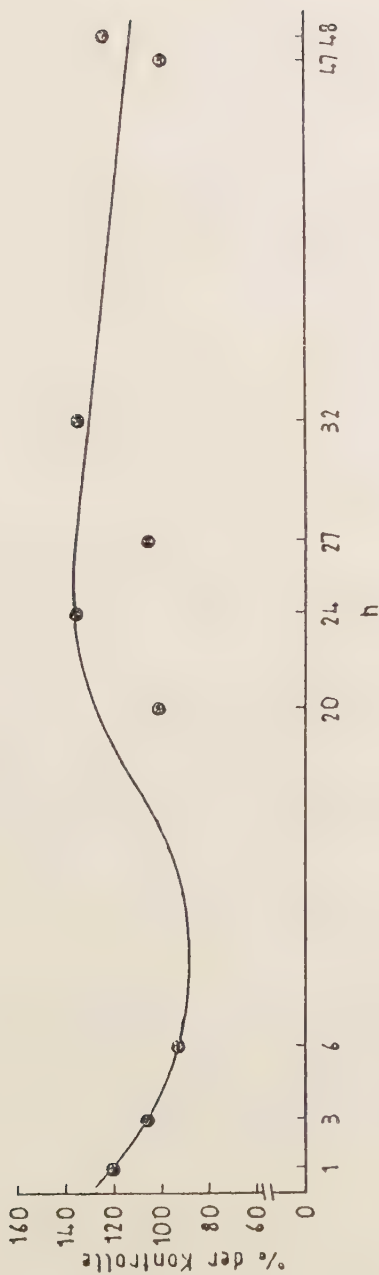


Abb. 8: Aktivität der NAGA in Monozyten-Makrophagen nach 24stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von L-T₃. Der Ausgangspunkt ist 100%, die Ergebnisse sind in % des Ausgangspunktes ausgedrückt.



n = 2

Abb. 9: Zeitabhängigkeit der ACEH in Monozyten-Makrophagen. Die Experimente wurden mit 0,01 $\mu\text{g/ml}$ L-T₃ nach den angegebenen Inkubationszeiten durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als % der Kontrolle aufgetragen.



n = 2

Abb. 10: Zeitabhängigkeit der NAGA in Monozyten-Makrophagen. Die Zellen wurden mit 0,01 µg/ml I-T₂ zwischen ein und 48 Stunden inkubiert. Die Ergebnisse der Experimente wurden als % der Kontrolle errechnet.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abrams, J.J., Grundy, S.M.:
Cholesterol Metabolism in Hypothyroidism and
Hyperthyroidism in Man.
J. Lip. Res., 22, 323-338, 1981
2. Agdeppa, D., Macaron, C., Mallik, T., Schnuda, N.D.:
Plasma High Density Lipoprotein Cholesterol in
Thyroid Disease.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 42, 726-729, 1979
3. Alam, S., Solen, K., u.a.:
The Mass Uptake of Cholesterylester from Low
Density Lipoproteins by Altered Smooth Muscle
Cells and Adventitial Cells by Human Aortas.
Circ. Res., 47, 347-383, 1980
4. Assmann, G.:
Lipidstoffwechsel und Atherosklerose
Schattauer Verlag, Stuttgart, 1982
5. Ballantyne, F.C., Epmetos, A.A., Caslake, M.,
Forsythe, S., Ballantyne, D.:
The Composition of Low-Density Lipoprotein and
Very-Low-Density Lipoprotein Subfractions in Prima-
ry Hypothyroidism and the Effect of Hormon-Replace-
ment Therapy.
J. Clin. Sci., 57, 83-88, 1979
6. Boyüm, A.:
Isolation of Mononuclear Cells and Granulocytes
from Human Blood. Isolation of Mononuclear Cells
by one Centrifugation, and of Granulocytes by
Combining Centrifugation and Sedimentation at 1 g.
Scand. J. Clin. Inv., 97 (Suppl. 21), 77-89, 1968

7. Brecher, P., Pyun, H.Y., Chobanian, A.V.:
Effect of Atherosclerosis on Lysosomal Cholesterol
Esterase Activity in Rabbit Aorta.
J. Lip. Res., 18, 154-163, 1977
8. Brown, M.S., Goldstein, J.L.:
Receptor-Mediated Control of Cholesterol Metabolism:
Study of Human Mutants has Disclosed how Cells
Regulate a Substance that is both Vital and Lethal.
Sci., 191, 150-154, 1976
9. Brown, M.S., Kovanen, P.T., Goldstein, J.L.:
Regulation of Plasma Cholesterol by Lipoprotein
Receptors.
Sci., 212, 628-635, 1981
10. Cecil:
Textbook of Medicine
W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1979⁵
11. Chait, A., Albers, J.J., Bierman, E.L.:
Regulatory Role of Triiodothyronine in the Degrada-
tion of Low Density Lipoproteins in Cultured
Human Fibroblasts.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 48, 887-889, 1979
12. Coates, P.M., Lau, M., Krulich, L., Brown, S.A.,
Koldovsky, O.:
Increase in Liver Acid Lipase of Thyroidectomized
Rats by Thyroid Hormones and its Inhibition by
Actinomycin D.
Biochim. Biophys. Acta, 584, 358-362, 1979

13. Cortner, J., Coates, P., Swoboda, E., Shnatz, J.:
Genetic Variation of Lysosomal Acid Lipase.
Pediat. Res., 10, 927, 1976
14. Dawber, T.R.:
Framingham Study: The Epidemiology of Atherosclerotic Disease.
Commonwealth Fund Ser., 1980
15. De Duve, C.:
Lysosomes revisited.
Eur. J. Biochem., 137, 391-397, 1983
16. De Duve, C.:
The Participation of Lysosomes in the Transformation of Smooth Muscle Cells to Foamy Cells in the Aorta of Cholesterol-Fed Rabbits.
Acta Cardiol., 20 (Suppl. 9-25), 1974
17. Eder, M., Gedigk, P.:
Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie
Springer-Verlag, Berlin u.a., 1977³⁰
18. Ferreri, L.F., Naito, H.K.:
Effect of Estrogens on Rat Serum Cholesterol Concentrations. Consideration of Dose, Type of Estrogen and Treatment Duration.
Endocrinology, 102, 1621-1627, 1978
19. Fowler, S., Shio, H., Wolinsky, H.:
Subcellular Fractionation and Morphology of Calf Aortic Smooth Muscle Cells.
J. Cell. Biol., 75, 166-184, 1977

20. Fowler, S., Berberian, P.A., Haley, N.Y., et al.:
Lysosomes, Vascular Intracellular Lipid Accumulation
and Atherosclerosis. Proceedings of the Internatio-
nal Conference on Atherosclerosis.
Raven Press, New York, 1979
21. Fredrickson, D.S.:
Familial High-Density Lipoprotein Deficiency:
Tangier Disease, the Metabolic Basis of Inherited
Disease.
McGraw-Hill, New-York, 1966
22. Goldstein, J.L., Brown, M.S.:
Atherosclerosis: the Low Density Lipoprotein
Receptor Hypothesis.
Metab., 26, 1257-1273, 1977
23. Hagemenas, F.C., Manaugh, L.C., Illingworth, D.R.,
Sundberg, E.E., Yatsu, F.M.:
Cholesteryl Ester Hydrolase Activity in Mononuclear
Cells from Patients with Type II Hypercholesterol-
emia.
Atherosclerosis, 50, 335-344, 1984
24. Haley, N.J., Shio, H., Fowler, S.:
Characterization of Lipid-Laden Aortic Cells from
Cholesterol-Fed Rabbits. I. Resolution of Aortic-
Cell Populations by Metrizamide Density Gradient
Centrifugation.
Lab. Invest., 37, 287-296, 1977
25. Henze, K., Chait, A.:
Lysosomal Enzyme Activities and Low Density Lipo-
protein Receptors in Circulating Mononuclear Cells.
Diabetologia, 20, 625-629, 1981

26. Henze, K.:
Blutfette - Risikobeurteilung
Öff. Gesundh. Wesen, 43, 423-425, 1981
27. Henze, K., Kudchodkar, B.J., Chait, A.,
Albers, J.J., Bierman, E.L.:
The Effect of Hydrocortisone on Cholesterol
Metabolism of Cultured Human Skin Fibroblasts.
Bioch. Biophys. Acta, 666, 199- 204, 1981
28. Hillmar, J., Henze, K., Zöllner, N.:
Einfluß von Trijodthyronin auf Cholesterol- und
Triglyzeridbiosynthese in Primärkulturen von
Hepatozyten erwachsener Ratten.
Kurzreferat beim Wissenschaftlichen Kongress der
Deutschen Gesellschaft für Ernährung, Gießen, 1983
29. Ho, Y.K., Brown, M.S., Bilheimer, D.W.,
Goldstein, J.L.:
Regulation of Low Density Lipoprotein Receptor
Activity in Freshly Isolated Human Lymphocytes.
J. Clin. Invest., 58, 1465-1474, 1976
30. Horn, K.:
Trijodthyronin (T_3), Zur Bestimmung und
pathophysiologischen Bedeutung.
Urban und Schwarzenberg, München, 1976
31. Katz-Feigenbaum, D., Braun, L., Wolinsky, H.:
Hydrolase Activities in the Rat Aorta V.
Circ. Res., 49, 733-741, 1981

32. Kritchevsky, D., Tepper, S.A., Story, J.A.:
Thyroid Hormone and Experimental Atherosclerosis
in Rabbits.
Atherosclerosis, 23, 249-252, 1976
33. Litwack, G.:
Biochemical Actions of Hormones. Volume IV.
Academic Press, New York, 1977
34. Löffler, G., Petrides, P.E., u.a.:
Physiologische Chemie
Springer-Verlag, Berlin u.a., 1979²
35. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L.,
Randall, R.J.:
Protein Mesurement with the Folin Phenol Reagent.
J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951
36. DeMartino, G.N., et al.:
A Possible Explanation of Myxedema and Hyperchole-
sterolemia in Hypothyroidism: Control of Lysosomal
Hyaluronidase and Cholesterol Esterase by Thyroid
Hormones.
Enzyme, 26 (1), 1-7, 1981
37. Meyer
Enzyklopädisches Lexikon, Bd. 2, Arteriosklerose,
Bibliographisches Institut, Mannheim, 1971
38. Muir, E.M., Bower, D.E.,
Inhibition of Pinocytosis and Induction of Release
of Lysosomal Overload of Arterial Smooth Muscle
Cells in Vitro.
Atherosclerosis, 50, 85-92, 1984

39. Nikkilä, E.A., Kekki, M.:
Plasma Triglyceride Metabolism in Thyroid Disease.
J. Clin. Inv., 51, 2103-2113, 1972

40. Nilsson-Ehle, P., Valdemarsson, S., Hedner, P.:
Lipolytic Enzymes and Lipoprotein Alterations
in Thyroid Dysfunction.
Scand. J. clin. Lab. Invest., 43, 547-551, 1983

41. O'Hara, D.D., Porte, D., Williams, Jr. and R.H.:
The Effect of Diet and Thyroxin on Plasma Lipids
in Myxedema.
Metabolism (Clin. Exp.), 15, 123, 1966

42. Oliver, M.F., Boyd, G.S.:
Reduction of Serum Cholesterol by Dextrothyroxine
in Men with Coronary Heart Disease.
Lancet I, 738-786, 1961

43. Peters, J.P., Man, E.B.:
The Significance of Serum Cholesterol in
Thyroid Disease.
J. Clin. Invest., 29, 1-11, 1950

44. Peters, J.P., Man, E.B.:
The Interrelations of Serum Lipids in Patients
with Thyroid Disease.
J. Clin. Invest., 22, 715-720, 1943

45. Peters, T.J., Müller, M., de Duve, C.:
Lysosomes of the Arterial Wall.
J. Exp. Med., 136, 1117-1139, 1972

46. Pschyrembel W.:
Klinisches Wörterbuch
Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1977²⁵³
47. Roskamm, H.:
Handbuch der Inneren Medizin, Band IX, Herz und
Kreislauf, Teil 3: Koronar Erkrankungen
Springer-Verlag, Berlin u.a., 1984
48. Russel, R., Glomset, Ph. and J.:
The Pathogenesis of Atherosclerosis
(Second of Two Parts).
The New Engl. J. Med., 19, 420-425, 1976
49. Schettler, G.:
Innere Medizin, Band I
Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1980⁵
50. Schettler, G.:
Arteriosklerose. Ätiologie, Pathologie,
Klinik und Therapie.
Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1961
51. Schmidt, R.F., Thews, G.:
Physiologie des Menschen
Springer-Verlag, Berlin u.a., 1977¹⁹
52. Scottolini, A.G., Bhagavan, N.V., Oshiro, T.H.,
Abe, S.Y.:
Serum High-Density Lipoprotein Cholesterol
Concentrations in Hypo- and Hyperthyroidism.
Clin. Chem., 26, 584-587, 1980

53. Severson, D.L., Hayden, L.J., Fletcher, T.:
Hormonal Regulation of Acid Cholesterol Ester
Hydrolase Activity: Effects of Triiodothyronine
and 17 α -Ethinylestradiol.
Can. J. Physiol. Pharmacol., 62 (2), 244-247, 1984
54. Severson, D.L., et al.:
Effect of Thyroid Hormones on Acid Cholesterol
Ester Hydrolase Activity in Rat Liver, Heart,
and Epididymal Fat Pads.
Biochim. Biophys. Acta, 675 (2), 256-264, 1981
55. Shio, H., Haley, N.J., Fowler, S.:
Characterization of Lipid-Laden Aortic Cells from
Cholesterol-Fed Rabbits. II. Morphometric Analysis
of Lipid-Filled Lysosomes and Lipid Droplets in
Aortic Cell Populations.
Lab. Invest., 39 (4), 390-397, 1978
56. Siegenthaler, W.:
Klinische Pathophysiologie
Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1979⁴
57. Sloan, H., Fredrickson, D.:
Enzyme Deficiency in Cholesterol Ester
Storage Disease.
J. Clin. Invest., 51, 1923, 1972
58. Small, D.M.:
Cellular Mechanisms for Lipid Deposition in
Atherosclerosis (Second of Two Parts).
The New Engl. J. Med., 297, 924-929, 1977

59. Takano, T., et al.:
Assay, Kinetics, and Lysosomal Localization of
an Acid Cholesterylesterase in Rabbit Aorta
Smooth Muscle Cells.
J. Biol. Chem., 249 (21), 6732-6737, 1974
60. Thompson, G.R., Soutar, A.K., Spengel, F.A.,
Jadhav, A., Gavigan, S.J.P., Myant, N.B.:
Defects of Receptor-Mediated Low Density Lipo-
protein Catabolism in Homozygous Familial Hyper-
cholesterinemia and Hypothyroidism in Vivo.
Proc. Natl. Acad. Sci., 78 (4), 2591-2595, 1981
61. Tulloch, B.R., Lewis, B., Fraser, T.R.:
Triglyceride Metabolism in Thyroid Disease.
Lancet, Feb. 24, 391-394, 1973
62. Walton, K.W., Scott, P.J., Dykes, P.W.,
Davids, J.W.L.:
The Significance of Alterations in Serum Lipids
in Thyroid Dysfunction II. Alterations of the
Metabolism and Turnover of ^{131}J -Low-Density Lipo-
proteins in Hypothyroidism and Thyrotoxicosis.
Clin. Sci., 29, 217-238, 1965
63. Wolinsky, H., Fowler, S.:
Participation of Lysosomes in Atherosclerosis.
The New Engl. J. Med., 297, 1173-1178, 1978
64. Wolinsky, H., Goldfischer, S., Capron, L.,
Capron, F., Coltoff-Schiller, B., Kasak, L.:
Hydrolase Activities in the Rat Aorta. I. Effect
of Diabetes Mellitus and Insulin Treatment.
Circ. Res., 42, 821-830, 1978

65. Yatsu, F., Hagemenas, F., Manaugh, L.,
Galumbos, T.:
Cholesteryl Ester Hydrolase Activity in Human
Symptomatic Atherosclerosis.
Lipids, 15, 1019-1022, 1980
66. Zöllner, N., Gröbner, W., Berger, Ch., Wolfram, G.:
Elektrophoretische Trennung der Serumlipoproteine
im Agarosgel mit Albuminzusatz.
Z. klin. Chem. klin. Bioch., 7, 525-529, 1969

DANKSAGUNG

Für die Überlassung des Themas möchte ich Herrn Prof. Dr. N. Zöllner und Herrn Prof. Dr. G. Wolfram herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Henze für die anregenden Diskussionen und die stete Unterstützung.

LEBENS LAUF

Name	Verena Margaretha RÜTHLEIN
geboren am	28. Februar 1960
in	Holzkirchen
wohnhaft in	8150 Holzkirchen, Karwendelstr. 2 tel. 08024-7802
Nationalität	deutsch
Konfession	römisch-katholisch
Familienstand	ledig
Vater	Alfred Rüthlein, Dipl.-Kaufmann
Mutter	Theresa Rüthlein, Hausfrau
Geschwister	Claudia Rüthlein (8.12.1957) Andrea Rüthlein (29.8.1964)
Schulen	- September 1966 bis Juli 1970 Volksschule Holzkirchen - September 1970 bis Juni 1979 Gymnasium Tegernsee
Studium	Beginn des Studiums der Human- medizin an der Ludwig-Maximilians- Universität München im November 1979 - Physikum im August 1981 - 1. Staatsexamen im August 1982 - 2. Staatsexamen im August 1984

